

ISOLASI DAN PENETAPAN KADAR GENISTEIN EKSTRAK KLOROFORM TEMPE KEDELAI “OVER” FERMENTASI DENGAN METODE KROMATOGRAFI

Chris Radityo Adi Nugroho*, Hartati Soetjipto, Yohanes Martono
Program Studi Kimia Fakultas Sains dan Matematika UKSW, Salatiga
*Email : 652013008@student.uksw.edu

Abstrak

Genistein merupakan salah satu isoflavon penting dalam tempe kedelai dan keberadaannya dapat dideteksi dengan menggunakan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Tujuan penelitian adalah mengisolasi dan memperoleh kadar genistein maksimum dalam isolat ekstrak kloroform tempe kedelai hasil fermentasi selama 8 hari menggunakan HPLC. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kandungan genistein berfluktuasi selama periode fermentasi 8 hari dimana kandungan genistein maksimum dalam isolat ekstrak kloroform tempe adalah sebesar 2046,54 µg/g isolat pada waktu fermentasi hari ke-4.

Kata kunci: Genistein, HPLC, Isoflavon

PENDAHULUAN

Isoflavon merupakan salah satu senyawa bahan alam yang memiliki potensi sebagai anti kanker, anti kolesterol, anti tumor dan anti virus (Pawiroharsono, 2001 dalam Agustina, 2005). Isoflavon termasuk golongan flavonoid yang banyak ditemukan pada tanaman kacang-kacangan terutama kedelai memiliki struktur Aglikon (Daidzein, Genistein, Glisitein), glikosida (daidzin, genistin, glisitin), malonil glikosida dan asetil glikosida (Dhaubhadel, 2011). Lee dkk. (2011) mengatakan bahwa banyaknya masing – masing kandungan Isoflavon dalam kedelai berturut - turut genistein (60%), daidzein (30%) dan glisitein (10%). Genistein merupakan isoflavon yang utama pada kedelai. Menurut data (Bhagwat, Haytowitz, & Holden, 2011) kandungan Genistein pada kedelai 18,77 mg/100g sedangkan kadar genestein pada tempe 36,15 mg/100g. Kandungan genistein pada tempe hasil fermentasi 0-9 hari pada fermentasi hari ke 4,7 dan 9 memiliki konsentrasi genistein yang cenderung tinggi serta konsentrasi yang tertinggi pada fermentasi hari ke 9 (Lewidharti, Soetjipto, & Andini, 2015). Sebagai upaya untuk memperoleh genistein langsung dari tempe busuk, maka penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan memperoleh kadar genistein maksimum dalam isolat ekstrak kloroform tempe kedelai hasil fermentasi selama 8 hari menggunakan HPLC.

METODE PENELITIAN

Bahan dan Piranti

1. Bahan

Sampel tempe diambil dari sebuah pengering tempe “X” di Gendongan, Salatiga, Jawa Tengah. Senyawa standar yang digunakan adalah genistein (*Sigma Chemical Co, Amerika Serikat*). Bahan kimia yang digunakan antara lain : Metanol, Kloroform, n-heksana (pro analisis Merck, *Germany*) dan untuk plat Kromatografi Lapis Tipis (KLT) digunakan plat silika gel 60 F₂₅₄, Merck *Germany*

2. Piranti

Neraca analitis (OHAUS PA214), Neraca 2 digit (OHAUS TAJ602), *Moisture Analyzer* (OHAUS MB 25), *Rotary Evaporator* (BUCHI R-114), blender (Philip HR-2108), *drying cabinet* (Bengkel Rekayasa Wandu), Kromatografi Kolom dan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) (Knauer Smartline 5000, Smartline pump 1000, Smartline UV Detector 2500).

Metode

1. Pembuatan Tempe dari Pengering “X” (Komunikasi Pribadi)

Kedelai yang digunakan dalam pembuatan tempe adalah kedelai import dari Amerika Serikat, perendaman selama 1 malam, sedangkan ragi yang digunakan adalah ragi yang berasal dari Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI).

2. Pengukuran Kadar Air

Pengukuran kadar air dilakukan dengan cara sebanyak kurang lebih 1 g sampel dimasukkan ke dalam alat *Moisture Analyzer*

3. Ekstraksi Isoflavon Aglikon (Lewidharti dkk., 2015 yang dimodifikasi)

Sebanyak 150 g tempe kering dimaserasi dalam metanol 80% selama 9 jam kemudian disaring dan filtrat dievaporasi sampai kering. Ekstrak dilarutkan dalam 50 mL metanol 50% dan n-heksana (1:2 v/v). Hasil separasi ekstrak fraksi polar dilarutkan dalam campuran metanol 96% dan kloroform (1:1 v/v) kemudian dilakukan pemisahan kembali. Fraksi kloroform dievaporasi menghasilkan ekstrak kasar isoflavon.

4. Metode Pemisahan dan Pemurnian dengan Kromatografi kolom (Wuryani, 1994 yang dimodifikasi)

Fase diam yang digunakan pada kromatografi kolom adalah silika gel, sedangkan fase gerak yang digunakan adalah etil asetat : asam format (90%) : air dengan perbandingan 10:2:3 v/v.

Fraksi hasil KLT yang mempunyai Rf sama digabungkan, kemudian diuapkan dengan *Rotary evaporator*.

5. Penentuan Kandungan Isoflavon Genistein menggunakan High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (Lewidharti dkk., 2015)

Identifikasi isoflavon dengan menggunakan metode HPLC dilakukan dengan pengkondisian instrumen HPLC dan pembuatan larutan sampel. Larutan sampel dibuat dengan mengambil 0,1 g ekstrak lalu dilarutkan dalam metanol 5 mL. Setelah larutan *disentrifuge*, disaring dan diambil 20 μ L untuk diinjeksikan ke dalam HPLC. Kromatogram HPLC dianalisis dengan menggunakan pembanding kromatogram isoflavon genistein standar.

Kondisi operasional Instrumentasi meliputi fase diam berupa Eurospher RP C-18 (150 \times 4,6 MM I.D., 5 μ m) Knauer GmbH-Jerman, fase gerak campuran metanol : asam asetat 0,1 M (48:52 (v/v)), kecepatan alir 1,2 mL/menit, volume injeksi (*loop*) 20 μ L, dan detektor UV 254 nm. Analisis kuantitatif genistein dilakukan dengan menghitung luas area kromatogram. Konsentrasi genistein dalam tempe dapat diketahui dengan menghitung persamaan garis dari kurva standar genistein antara luas kromatogram terhadap konsentrasi genistein.

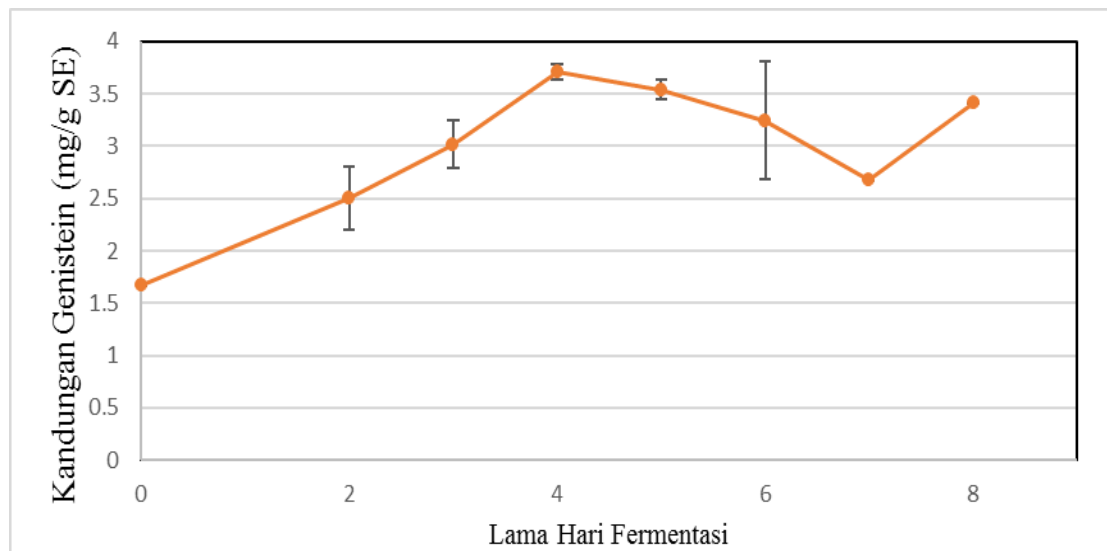
HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Hasil Pengukuran Kandungan Genistein Tertinggi

Kandungan genistein dari ekstrak isoflavon selama proses fermentasi ditampilkan pada Tabel 1. dan Gambar 1.

Tabel 1 dan Gambar 1 menunjukkan hasil kandungan isoflavon genistein pada hari ke 0 sebesar $1,68 \pm 0,0056$ mg/g. Peningkatan terjadi pada hari ke 2 sampai hari ke 4 yang masing-masing besarnya $2,55 \pm 0,0185$ mg/g; $3,01 \pm 0,0123$ mg/g dan $3,71 \pm 0,0477$ mg/g. Selanjutnya pada hari ke 5 terjadi penurunan yang cukup tajam hingga hari ke 7 yaitu secara berturut-turut $3,54 \pm 0,0323$ mg/g; $3,25 \pm 0,0236$ mg/g dan $2,68 \pm 0,0034$ mg/g. Pada hari ke 8 terjadi peningkatan kembali kandungan genistein yaitu sebesar $3,41 \pm 0,0167$ mg/g. Kandungan isoflavon genistein tertinggi selama proses fermentasi diperoleh pada lama fermentasi tempe hari ke 4 yaitu sebesar $3,71 \pm 0,0477$ mg/g.

Tabel 1 dan Gambar 1 menunjukkan hasil kandungan isoflavon genistein pada hari ke 0 sebesar $1,68 \pm 0,0056$ mg/g. Peningkatan terjadi pada hari ke 2 sampai hari ke 4 yang masing-masing besarnya $2,55 \pm 0,0185$ mg/g; $3,01 \pm 0,0123$ mg/g dan $3,71 \pm 0,0477$ mg/g. Selanjutnya pada hari ke 5 terjadi penurunan yang cukup tajam hingga hari ke 7 yaitu secara berturut-turut $3,54 \pm 0,0323$ mg/g; $3,25 \pm 0,0236$ mg/g dan $2,68 \pm 0,0034$ mg/g. Pada hari ke 8 terjadi peningkatan kembali kandungan genistein yaitu sebesar $3,41 \pm 0,0167$ mg/g. Kandungan isoflavon genistein tertinggi selama proses fermentasi diperoleh pada lama fermentasi tempe hari ke 4 yaitu sebesar $3,71 \pm 0,0477$ mg/g.



Gambar 1. Grafik Rendemen Ekstrak Isoflavon dan Kandungan Isoflavon Selama Proses Fermentasi

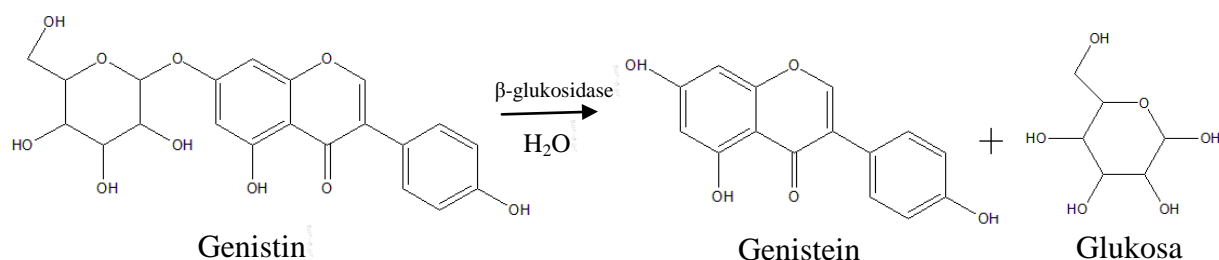
Tabel 1. Purata Kandungan Genistein (% b/b ± SE) dari Ekstrak Isoflavon Hari ke 0-8

Lama Fermentasi	Kandungan Genistein (mg/g ekstrak ± SE)
0	1,68 ± 0,0056
2	2,55 ± 0,0185
3	3,01 ± 0,0123
4	3,71 ± 0,0477
5	3,54 ± 0,0323
6	3,25 ± 0,0236
7	2,68 ± 0,0034
8	3,41 ± 0,0167

Menurut Lewidharti *dkk.*, (2015), melaporkan bahwa kandungan genistein dalam tempe yang difermentasi 0-9 hari, bersifat fluktuatif dengan rendemen isoflavon tertinggi pada hari ke 6 sebesar 51,23% (b/b) sedangkan kandungan genistein tertinggi diperoleh pada hari ke 9 yaitu sebesar 324,27 µg/g. Bila dibandingkan dengan penelitian Lewidharti *dkk.* (2015), penelitian ini menghasilkan kandungan genistein yang jauh lebih besar. Perbedaan rendemen ekstrak isoflavon dan kandungan genistein yang naik turun dan jauh lebih besar dari hasil-hasil penelitian lain, dapat disebabkan karena beberapa hal. Menurut Aussenac *dkk.*, (1998) kandungan isoflavon kedelai selain dipengaruhi oleh varietas benih kedelai juga kondisi lingkungan pertumbuhan, seperti waktu tanam, akan berpengaruh terhadap komposisi isoflavon yang dihasilkan. Artinya kandungan isoflavon awal dari kedelainya sudah berbeda-beda. Cheng *dkk.*, (2013) juga melaporkan bahwa kedelai yang difermentasi selama 6 hari menggunakan kapang yang berbeda menunjukkan jumlah isoflavon aglikon genistein yang berbeda pula.

Genistein tertinggi dicapai pada fermentasi hari 4 kemudian mengalami penurunan drastis hingga tinggal ¼ nya. Seiring dengan bertambah waktu fermentasi terjadi fluktuasi yang tidak mencolok hasil ini sesuai dengan (Utari dan Riyadi, 2010). Fermentasi kedelai menjadi tempe meningkatkan kandungan isoflavon aglikon melalui hidrolisis β glukosidase (Iswandari, 2006). Peningkatan kandungan isoflavon genistein pada lama pemeraman tempe hari ke 1, 4 dan 8 diduga

karena terjadi perubahan isoflavon terikat (genistin) menjadi isoflavon aglikon (genistein). Reaksi hidrolisis genistin menjadi genistein disajikan pada Gambar 2.



Gambar 2. Reaksi Hidrolisis Glukosida Isoflavon menjadi Aglikon Isoflavon (Istiani, 2010)

Genistein ada dalam bentuk glikosida sedangkan genistein dalam bentuk aglikonnya. Isoflavon yang dominan pada kedelai terdapat dalam bentuk glikosida, sedangkan dalam produk kedelai yang mengalami fermentasi adalah aglikonnya (Coward dkk., 1993).

Pemurnian Genestein

Hasil pemisahan genistein dari pengotor yang masih tertinggal dalam sampel menggunakan kromatografi kolom disajikan pada Gambar 4 sedangkan kromatogram hasil KLT Kromatografi kolom disajikan pada Gambar 3.

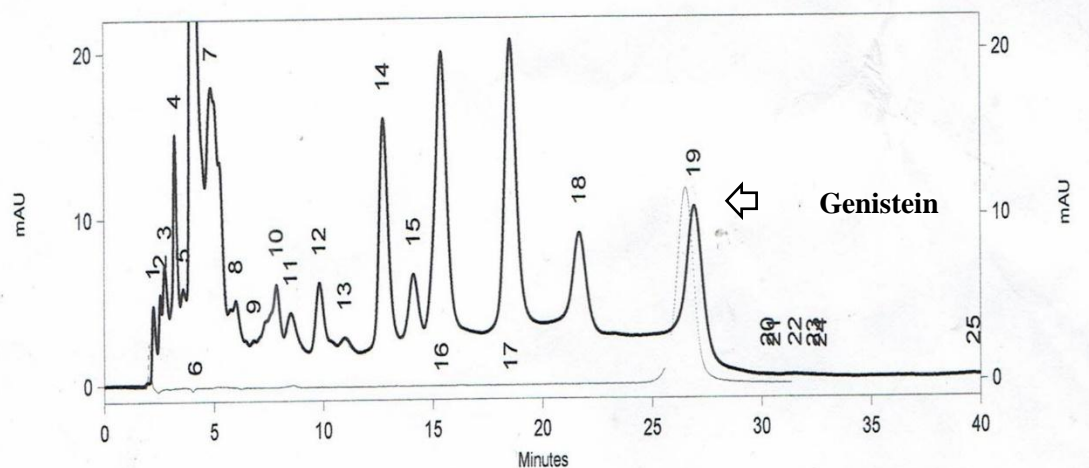


Gambar 3. Hasil KLT Fraksinasi Kromatografi Kolom Pada Ekstrak Sampel

Gambar 3 menunjukkan hasil KLT fraksinasi ekstrak sampel dengan menggunakan kromatografi kolom menghasilkan 10 fraksi. Terlihat pada fraksi 1 – 6 terdapat noda yang memiliki R_f sama dengan noda standar genistein, ini menunjukkan bahwa noda tersebut mengandung genistein. Sedangkan pada fraksi 7 - 10 tidak terdapat noda yang mirip dengan noda pada standar genistein. Fraksi 1 – 6 digabung kemudian dipekatkan dengan gas N_2 sampai kering. Hasil isolat genistein yang diperoleh sebanyak 0,0434 g.

Analisis Isolasi Genistein dengan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC)

Analisis dengan HPLC bertujuan untuk mengidentifikasi dan menentukan kuantitas senyawa isoflavon termasuk genistein dalam sampel tempe pada waktu fermentasi hari ke- 4. Kromatogram HPLC isolat genistein sampel tempe hari ke 4 ditampilkan pada Gambar 4.



Gambar 4. Kromatogram Isolat Genistein Sampel hari ke 4.

Kromatogram HPLC isolat genistein muncul pada waktu retensi 26,93 menit berdasarkan kromatogram standar gensitein dan beberapa puncak yang muncul di menit – menit pertama diduga merupakan isoflavonoid glikosida. Hasil kromatogram menunjukkan kadar genistein dalam isolat isoflavon adalah 2046,54 $\mu\text{g/g}$ isolat. Ni'mah (2009) melaporkan bahwa kandungan genistein pada kedelai sebesar 1.286,9 $\mu\text{g/g}$. Sedangkan menurut (Ariani *dkk.*, 2011) kandungan genistein dalam tempe berbahan baku kedelai kuning Madura pada lama waktu fermentasi 3 hari sebesar 5.683,14 $\mu\text{g/g}$. Bila dibandingkan dengan penelitian (Ni'mah, 2009) dan (Ariani *dkk.*, 2011) penelitian ini menghasilkan kandungan genistein yang relatif lebih besar dari penelitian (Ni'mah, 2009) namun lebih rendah dibandingkan dengan penelitian (Ariani *dkk.*, 2011). Hal ini dimungkinkan terjadi karna jenis dan varietas kedelai yang digunakan berbeda sehingga dapat mempengaruhi kandungan isoflavonnya.

KESIMPULAN

1. Selama proses fermentasi Kandungan isoflavon tertinggi dihasilkan pada hari ke 4 sebesar $3,71 \pm 0,0477$ mg/g sampel.
2. Kadar genistein isolat dalam tempe fermentasi hari ke 4 dengan menggunakan fase gerak etil asetat : asam format (90%) : air dengan perbandingan 10:2:3 v/v dan fase diam silika gel dan HPLC sebesar 2046,54 $\mu\text{g/g}$ isolat.

DAFTAR PUSTAKA

- Agustina, W. (2005). Profil kandungan daidzein dan genistein pada tempe gembus selama proses fermentasi Widiastuti Agustina, 1–66.
- Ariani, S. R. D., Handajani, S., & Handayani, S. (2011). BLOKIMIA (Kode : F-13) ISBN : 978-979-1533-85-0 STUDI KANDUNGAN ISOFLAVON DAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN SECARA IN VITRO PADA TEMPE KEDELA KUNING (Glycine max L Merrill) MADURA DENGAN, 978–979.
- Aussenac T, Lacombe S, Dayde J. (1998). Quantification of isoflavones by capillary zone electrophoresis in soybean seeds : effects of variety and environment. *Am. J. Clin. Nutr.* 68(suppl):1480S-1485S.
- Bhagwat, S., Haytowitz, D. B., & Holden, J. M. (2011). USDA Database for the Isoflavone Content of Selected Foods. *U.S. Department of Agriculture*, 1–156. https://doi.org/http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/12354500/Data/isoflav/Isoflav_R2.pdf
- Cheng, K.C., Wu, J.Y. dan Lin, J.T. (2013). Enhancements of Isoflavone Aglycones, Total Phenolic Content, and Antioxidant Activity of Black Soybean by Solide-state Fermentation with *Rhizopus spp.* *Eur. Food Res. Technol.* 236: 1107-1113.

- Coward L, Barnes NC, Setchell KDR, Barnes S. (1993). Genistein, daidzein, and their β -glycoside Conjugates : Antitumor Isoflavones in Soybean Food from American and Asian diets. *J. Agric. Food Chem.* 41 :1961.
- Dhaubhadel, S.(2011). Soybean biochemistry chemistry and physiology. Regulation of Isoflavone biosynthesis in soybean seeds. Canada: Southern crop protection and food research center, 243-58.
- Istiani, Y. (2010). Karakterisasi Senyawa Bioaktif Isoflavon dan Uji Aktivitas Antioksidan dari Ekstrak Etanol Tempe Berbahan Baku Koro Pedang (*Canavalia ensiformis*), 1–110.
- Lee, J., H. Seung Kim., Y. Sang Song. (2011). Genistein as a Potential Anticancer Agent against Ovarian Cancer. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 2(2), pp.96-104.
- Lewidharti, R. S., Soetjipto, H., & Andini, S. (2015). DINAMIKA KONSENTRASI GENISTEIN DALAM PROSES ISBN : 978-602-73159-0-7.
- Rima Jannatun Ni'mah. (2009). Kadar genistein dan daidzein pada kedelai, ampas tahu, dan oncom merah.
- Utari, D. M., & Riyadi, H. (2010). (Effects of Soybean Processing Becoming Tempeh and the. *Pgm*, 33(2), 148–153.
- Wuryani. (1994). Isolasi Genistein dari Tempe Secara Kromatografi. *Jkti*, 4(1), 24–29.